

FACULDADE DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO



Dispositivos “Low-Cost” para Aplicações em Espectroscopia de Biofluidos

Bruno Rafael

Mestrado Integrado em Engenharia Eletrotécnica e de Computadores

Orientador: João Paulo Trigueiros da Silva Cunha, PhD

19 de Julho de 2019

Resumo

Nesta dissertação é estudada a hipótese de que se pode obter um valor aproximado da concentração de compostos biológicos (por exemplo glicose) encontrados em biofluidos como o suor com base na intensidade da radiação refletida, como parte de um projeto para produzir um dispositivo para aplicações médicas, nomeadamente a sua monitorização com futuros dispositivos *wearables*.

Os biofluidos testados continham diferentes concentrações de glicose e cloreto de sódio, ambos compostos encontrados em relativamente grandes quantidades no suor humano, e que quando em concentrações anormais poderão ser indicativos de problemas de saúde.

Como sensor usamos um detector de fumos de baixo custo que foi adaptado com sucesso para ser testado em líquidos que, por serem mais densos, têm capacidade de refletir muito mais que os gases. Um dispositivo em impressão 3D foi desenvolvido para permitir esta adaptação.

Foi usada uma placa de desenvolvimento deste sensor com dois díodos luminosos, que operam nos comprimentos de onda 850 nm e 470 nm, e que foram usados em espectroscopia por refletância. É descrito como a placa foi programada, e como algumas dificuldades foram ultrapassadas.

Os resultados mostram que, embora seja possível observar experimentalmente algumas das relações que estão previstas na teoria, a medição da concentração de substâncias não é trivial e tem fraca reprodutibilidade. Isto deve-se a diversos fatores que foram identificados e que vão desde a temperatura ambiente e a temperatura do sensor (que vai aumentando com o tempo de funcionamento), até erros na criação das amostras ou contaminação das mesmas, que por se tratar de volumes tão reduzidos de soluto, pode ter grande impacto nas medições.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer antes de mais ao professor João Paulo Cunha e a todos os elementos do BRAIN que de alguma maneira contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Gostaria de agradecer a todos os meus amigos que partilharam comigo as suas experiências, e proporcionaram gargalhadas aos almoços e cafés. Acima de tudo, obrigado ao Paulo e às Helenas por não se importarem que os chateie a todas as horas do dia.

Finalmente gostaria de agradecer aos meus pais e à minha irmã por todo o apoio e compreensão.

Bruno Rafael

“All things are difficult before they are easy.”

Thomas Fuller

Conteúdo

1	Introdução	1
1.1	Apresentação do Projeto	1
1.2	Estrutura da Dissertação	2
2	Revisão Bibliográfica	3
2.1	Bases da Espectroscopia	3
2.2	Aplicações médicas	6
2.3	Análise de Dados	7
2.3.1	Aprendizagem não-supervisionada	7
2.3.2	Aprendizagem supervisionada	8
3	Projeto do Sistema	11
3.1	Configuração e Protocolo Experimental	11
3.2	Placa de Desenvolvimento	15
4	Discussão e Resultados	19
5	Conclusões e Trabalho Futuro	25
5.1	Satisfação dos Objetivos	25
5.2	Trabalho Futuro	25
A	Estrutura impressa	27

Lista de Figuras

2.1	Princípio de funcionamento de um espectrómetro ótico.	4
2.2	[25] Algoritmo K-means com três centroides.	8
2.3	[27] Algoritmo EM com modelo gaussiano.	9
2.4	[28] Regressão linear.	9
2.5	[29] SVM com margem linear.	10
3.1	[30] Tabela de concentrações de alguns constituintes encontrados no suor.	12
3.2	Esquema da configuração usada.	14
3.3	Configuração sensor + amostra.	14
3.4	Estrutura impressa com sensor.	14
3.5	Fluxo de dados do sistema.	16
3.6	Diagrama de blocos do sensor (simplificado).	17
3.7	Diagrama de funcionamento do sensor com 2 LEDs ativos.	17
4.1	Resposta da glicose à luz IV para uma intensidade de 104 pulsos.	20
4.2	Resposta da glicose à luz azul para uma intensidade de 104 pulsos.	20
4.3	Resposta de diferentes concentrações de NaCl à luz IV ($R_{TIA}=200k\Omega$).	21
4.4	Resposta de diferentes concentrações de NaCl à luz IV.	21
4.5	Resposta de diferentes concentrações de NaCl à luz azul.	22
4.6	Iluminância em função da concentração de NaCl com incidência de $n=104$ pulsos.	22
4.7	Derivada da iluminância em função do número de pulsos para diferentes concentrações de NaCl.	23
A.1	Estrutura impressa produzida em Sketchup.	27

Abreviaturas e Símbolos

ADC	Analog to Digital Converter
BRAIN	Biomedical Research and INnovation
FPGA	Field Programmable Gate Array
I ² C	Inter-Integrated Circuit
INESC-TEC	Instituto de Engenharia de Sistemas e Computadores, Tecnologia e Ciência
IV	Infra-vermelho
LED	Light Emitting Diode
NaCl	Sodium Chloride
NIR	Near Infrared
OPL	Optical Path Length
PDM	Pulse-Density Modulation
PFM	Pulse-Frequency Modulation
PLA	Polylactic Acid
SNR	Signal to Noise Ratio
SOG	Special Optical Glass
TDL	Tunable Diode Laser
USB	Universal Serial Bus

Capítulo 1

Introdução

Existem atualmente diversos métodos de análise de materiais que permitem a identificação e classificação de estruturas ou compostos. Uma técnica bastante reconhecida deste tipo de análise é a espectroscopia, que se baseia na interação do espectro eletromagnético com os átomos ou moléculas que compõem um material, seja ele um sólido, líquido ou gás.

A forma como a espectroscopia é aplicada foca-se na medição da absorção, emissão e reflexão do material quando irradiado, e na comparação da resposta da amostra a resultados já conhecidos para diferentes comprimentos de onda. Esta é uma solução com bastante sucesso quando se sabe a resposta em frequência do material analisado visto esta ser dependente dos seus constituintes. Tem aplicações para trabalho de laboratório, onde a distância entre o material e o sensor é mínima, mas também pode ser usado para descobrir características de outros planetas [1].

De modo geral, a ferramenta utilizada para obter informação fidedigna com recurso à espectroscopia é o espectrómetro, que analisa a resposta do material numa elevada gama de frequências, e portanto capaz de captar todas as variações no espectro, indicativo da presença de certas ligações atómicas.

1.1 Apresentação do Projeto

Neste trabalho é proposto que, com recurso às instalações do BRAIN, grupo do INESC-TEC Porto, seja analisada a intensidade do sinal refletido da glicose e do cloreto de sódio (NaCl), como parte de um projeto de estudar compostos biológicos mais complexos como o suor. Saber a concentração destes compostos no suor pode ser interessante do ponto de vista médico, abrindo a possibilidade da criação de novas ferramentas de diagnóstico não invasivas. Já foi estudada a existência de uma correlação entre a quantidade de glicose no suor e no sangue [2], pelo que uma análise não-invasiva e indolor pode ser de grande relevância para diabéticos. A quantidade de cloreto de sódio presente no suor também aumenta com o estado de hidratação do sujeito em análise [3]. Assim, é proposto que se implemente um dispositivo portátil de baixo custo, rápido e capaz de realizar avaliações a amostras de diferentes concentrações.

Uma parte considerável do trabalho desenvolvido incidirá sobre o controlo de um sensor de dois LEDs (diferentes comprimentos de onda) para analisar amostras quanto à sua composição. Para tal, serão efetuadas medições à iluminância da luz reflectida da incidência dos dois LEDs (850nm, infra-vermelho e 470nm, luz azul). Esta forma de distinção dos componentes está assim dependente do espectro de absorção e emissão das substâncias analisadas.

No futuro, consoante a viabilidade desta técnica, este sensor poderá ser utilizado num dispositivo *wearable*, graças ao seu relativo baixo custo, pequeno tamanho e baixo consumo energético.

1.2 Estrutura da Dissertação

Para além da introdução, esta dissertação contém mais quatro capítulos. No capítulo 2 é descrito o estado da arte e são apresentadas noções sobre a espectroscopia que podem ajudar a interpretar resultados, projetos onde estas técnicas foram usadas, como para aplicações médicas e finalmente fala-se sobre algumas técnicas de análise de dados utilizadas. No capítulo 3 é descrito todo o sistema, *hardware* e *software*, assim como o protocolo experimental e o raciocínio que levou a certas decisões serem tomadas. No capítulo 4 são discutidos os resultados, fazendo um paralelo entre o que era esperado e o que se obteve. No capítulo 5 conclui-se sobre o trabalho realizado, sobre o uso do sensor estudado como um dispositivo *wearable* e fala-se no trabalho que se pode desenvolver.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

Neste capítulo são apresentadas técnicas de espectroscopia e alguns estudos relacionados com as mesmas. Será feito um sumário dos sensores utilizados para caracterização de amostras quanto à sua composição e em particular, de amostras onde a glicose e o cloreto de sódio estão presentes. Por fim, são apresentados alguns algoritmos de análise de dados.

2.1 Bases da Espectroscopia

Espectroscopia é um conjunto de técnicas de medição que permite o levantamento de propriedades físico-químicas de um material ou substância com recurso à incidência de radiação. Diferentes técnicas podem ser usadas para este propósito, sendo que se podem efetuar medições à intensidade de luz absorvida pela substância, à intensidade da luz refletida, propriedades da luz refletida, entre outros.

Para obter resultados direcionados para um determinado material, deve-se fazer variar o comprimento de onda do raio incidente, visto diferentes materiais reagirem de maneira diferente a diferentes comprimentos de onda.

A onda incidente pode pertencer a diferentes regiões do espectro, com base no seu comprimento de onda (λ) ou frequência (ν), relacionado pela seguinte equação:

$$c = \lambda \nu \quad (2.1)$$

Onde c é a constante para a velocidade da luz no vácuo. As diferentes regiões do espectro são ondas-rádio, micro-ondas, infra-vermelhos, visível, ultra-violeta, raios-x e raios gama em ordem crescente de energia (e decrescente de comprimento de onda).

Classicamente, aprendemos que quando um qualquer material é irradiado três coisas podem acontecer: o feixe pode atravessar o material, pode ser refletido e pode ser absorvido. Chama-se ao material de transparente quando uma parte significativa do que é irradiado não interage com ele, sendo que um material pode ser transparente numa certa gama de frequências e não noutra.

Ao coeficiente que relaciona a intensidade da luz incidente (I_0) e a que atravessa a amostra (I) é chamado de transmitância e as suas dependências estão explicadas na lei de Lambert-Beer

através da equação 2.2, onde ϵ é o coeficiente de absorção molar, C é a concentração de moléculas e x é a distância atravessada pela luz no meio.

$$I = I_0 e^{-\epsilon C x} \quad (2.2)$$

A absorvância (A) pode ser calculada através do logaritmo da transmitância [4], o que nos dá a equação 2.3.

$$A = \ln\left(\frac{I_0}{I}\right) = \epsilon C x \quad (2.3)$$

Espectroscopia é uma técnica fortemente focada no aspecto experimental, e baseada na comparação entre resultados conhecidos e os do material que queremos analisar. Estes resultados são normalmente obtidos com recurso a um espectrómetro, que quando óticos, permitem prever picos de absorção no espectro eletromagnético. Este funcionamento está ilustrado de forma simplificada na figura 2.1.

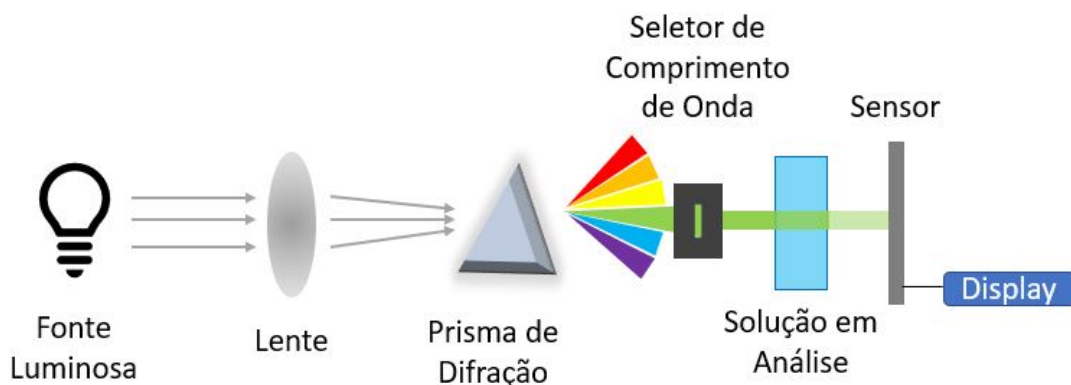


Figura 2.1: Princípio de funcionamento de um espectrómetro ótico.

É de destacar que o feixe na figura 2.1 tem menor intensidade depois de atravessar a solução, evidência de que parte da luz foi absorvida pela solução.

A lei de Lambert-Beer mantém-se desde que a amostra seja homogênea e as partículas presentes absorvam a luz de forma independente entre si. Estas limitações, assim como outras discutidas brevemente em [5], tornam esta equação dependente de fatores como o efeito que concentrações muito reduzidas ou muito elevadas podem ter no solvente [6]. Um fator importante em falta é a luz refletida, o que implica que a absorvância é sempre menor que o valor dado em 2.3.

Um modelo que pode ser usado para tentar completar esta lei é o de Kubelka-Munk, que relaciona o coeficiente de absorção com o de reflectância difusa através da equação 2.4. Chama-se difusa porque tem em conta toda a radiação refletida desconsiderando a direção que toma, mas não inclui a reflexão provocada pela mudança de meio, quando este existe.

$$\frac{k}{s} = \frac{(1 - R_\infty)^2}{2R_\infty} \quad (2.4)$$

Onde k é o coeficiente de absorção molar, s é a constante de dispersão e R_{∞} é a reflectância difusa. Em [7] é explicado como é que a partir destas relações foi possível chegar a conclusões acerca do tamanho das partículas em estudo. Este modelo não foi projetado para ser aplicado à generalidade dos materiais e como tal contém outros problemas que invalidam as suas medições, como já vimos. No entanto, ainda é uma fórmula aplicada como aproximação do valor real [8].

Atualmente, é usado bastante na espectroscopia NIR (near-infrared, referente aos comprimentos de onda entre o visível e infra-vermelho) por reflectância a relação logarítmica da equação 2.5, onde R é a reflectância absoluta e C a concentração [9].

$$\log\left(\frac{1}{R}\right) = kC \quad (2.5)$$

Quando em análise estão materiais ou amostras com variações no fator de refração, a luz pode ser refletida ou refratada, o que implica que o percurso percorrido pela luz (x) é variável. Isto está descrito na literatura como o tamanho médio do caminho ótico (OPL), sendo este valor uma média pois o caminho do fóton não é sempre o mesmo [10]. No caso de análise a líquidos miscíveis, a única mudança significativa no índice de refração deverá ser na fronteira entre o ar e o líquido.

É importante notar que, apesar de a equação da reflectância 2.5 e da absorvância 2.3 terem termos em comum, não é possível estabelecer uma correlação linear entre ambos, devido a simplificações nas fórmulas.

Por vezes, radiação é absorvida por moléculas que podem ser excitadas. Quando isso acontece, elétrons dessa molécula passam para um nível de energia superior, do qual saem passado algum tempo dando-se a desexcitação. Neste processo, a energia é libertada sob a forma de um fóton num processo chamado fluorescência, que pode ser estudado na chamada espectroscopia Raman. Tipicamente, a radiação usada para excitar as moléculas é na gama ultra-violeta (UV) [11]. A energia emitida pode também ser maior ou menor do que a que foi inicialmente fornecida, consoante o nível de energia inicial. Comparativamente à radiação refletida, a radiação emitida é praticamente desprezável, pelo que o seu estudo só é possível com o uso de um filtro rejeita-banda. Esta técnica tem muitas aplicações, entre as quais a medição do colesterol [12].

A área de espectroscopia focada nesta tese é a de reflectância que usa radiação próxima do infra-vermelho, devido às propriedades inerentes do sensor utilizado. Este sensor foi adquirido anteriormente ao início do trabalho desenvolvido, mas cujas características foram escolhidas tendo em conta este e serão discutidas no capítulo 3.

A espectroscopia de reflectância está intimamente ligada à espectroscopia de absorção, que é baseada na absorção de energia por parte de diferentes ligações atómicas que inclui O-H, C-H, C-C, entre outras [13].

Um subconjunto de técnicas aplicadas nestes comprimentos de onda são as que usam modulação por frequência, conseguindo obter resultados com menores valores de ruído. Em [14] foi estudada a aplicabilidade de um sensor com dois TDLs (díodo de laser ajustável) de frequências NIR para aplicar à deteção da concentração de gases. Este sensor parece em tudo similar ao utilizado neste projeto, com a nuance de que em [14] os díodos luminosos são ajustáveis quanto

à frequência, permitindo aplicar modelação de pulsos por frequência (PFM). No caso do sensor utilizado neste projeto isso não é possível, mas é possível modular quanto à densidade de pulsos (PDM), aumentando ou diminuindo a intensidade do sinal, como será visto no capítulo 3.

Para aplicações específicas é possível utilizar uma gama restrita de frequências. Por exemplo em medicina usa-se tomografia computadorizada, que aplica estes princípios na gama de frequências raio-x para analisar estruturas internas do corpo.

A gama NIR é bastante usada para espectroscopia de reflexão, já que um elevado número de ligações atômicas, em particular presentes em matéria orgânica, tem picos de absorção nessas gamas [15][9], permitindo aplicar a equação 2.5 para descobrir em que concentração essas ligações existem.

2.2 Aplicações médicas

Um exemplo de sensores habitualmente comercializados e utilizados com o objectivo de dar informação sobre a quantidade de glicose no sangue são os glicosímetros. Estes normalmente requerem uma gota de sangue para fazer a medição, mas está em insurgência tecnologia capaz de tornar este processo indolor. A maneira como isto é feito é através da espectroscopia, analisando o quão absorvente certas partes do corpo são à radiação. Um dos primeiros estudos com resultados significativos terá sido [16], no qual foi usada espectroscopia NIR de reflexão. O dispositivo criado seria um espectrómetro de gama 1050 a 2045 nm de encaixar no antebraço.

Uma ferramenta que permite elevada precisão e estatísticas sobre vários parâmetros do sangue é o sistema de análise hematológica. Estes dispositivos são de grande porte e permitem uma contagem automática do número de células numa amostra [17]. Esta ferramenta veio, por sua vez, automatizar o processo de contagem manual. É uma solução industrial que permite analisar mais parâmetros, mas também de custo mais elevado.

Dispositivos de pequeno porte que permitem automatizar este tipo de processos têm sempre uma unidade programável. Uma solução é usando um FPGA, tal como foi feito em [18], onde foi realizada uma pletismografia (medição do volume do sangue nos vasos sanguíneos), mais uma vez com radiação NIR (comprimentos de onda 935-1070 nm). Parte da automatização do processo descrito é um modelo preditivo de erros com base numa rede neuronal, criado em MATLAB.

Analisando a concentração de substâncias como o cloreto de sódio (sal) no suor de uma pessoa é possível conhecer várias informações sobre a sua condição física. A título de exemplo, alta concentração de cloro no suor pode ser indicativo de fibrose cística, uma doença diagnosticável pelo chamado "teste do suor"[19].

Os sensores que analisam suor são usados mais proeminentemente na área dos *wearables*. São sensores que se colam à pele ou integrados em roupa e permitem a análise do suor, por exemplo, enquanto uma pessoa faz exercício físico [20]. Uma solução deste tipo já foi implementada, por exemplo em [21], para medição do pH.

Também já existem estudos que partem de conceitos semelhantes àqueles que estamos a procurar aplicar. A partir de NaCl, para estudar a hidratação de um indivíduo [3], foi criado um

dispositivo *wearable* que consegue fornecer dados em tempo real [22]. A partir da glicose para ajudar à monitorização da diabetes [2], uma solução é [23] em que um *wearable* é colado na pele e é capaz de administrar insulina quando necessário. Neste artigo estão explicadas algumas das dificuldades na fabricação deste tipo de dispositivos, em particular a forma como são controlados vários sensores de temperatura, pH, entre outros fatores que fazem variar as propriedades do suor. Assim, fica estabelecido um controlo de malha-fechada usado para adquirir dados mais fidedignos da concentração de glicose no suor.

2.3 Análise de Dados

Aqui encontram-se de forma resumida algumas das técnicas de análise de dados mais conhecidas. O uso destas permite extrair informação diferenciadora a partir de um conjunto de dados de diferentes amostras, dividindo os dados por grupos. Para isso, é preciso criar condições para a replicabilidade dos resultados, pelo que se procura estudar e controlar a influência das condições em que as amostras foram obtidas (quanto à temperatura, técnicas usadas, entre outros).

Para análise de grandes quantidades de dados uma das soluções mais reputada é a de *machine learning*, que pode ser dividida em aprendizagem supervisionada e não-supervisionada. De maneira geral, usam-se algoritmos de aprendizagem supervisionada quando se sabe à partida que tipo de resultados serão obtidos com base nos estímulos recebidos e aprendizagem não-supervisionada como um meio para estabelecer padrões. Seguidamente estão apresentados alguns destes.

2.3.1 Aprendizagem não-supervisionada

Fazem parte desta categoria modelos que tiram informação de dados não etiquetados. *Clustering* é um dos modelos mais conhecidos e que assenta nos princípios de que:

1. Todos os pontos no universo de dados pertencem a um grupo,
2. Todos os grupos têm um centroide.

Com base na dispersão dos dados podemos querer usar diferentes algoritmos. É de notar que chama-se modelo mistura a modelos que atribuem valores de pertença aos seus pontos. Alguns dos mais interessantes são:

- *K-means clustering*: Um algoritmo de aprendizagem não-supervisionada rápido, que devido à sua popularidade, existem já desenvolvidas várias implementações computacionalmente eficientes deste. É também escalável, não sendo tão trivial obter bons resultados para grandes conjuntos de dados [24]. Obtém os melhores resultados quando os conjuntos de dados, de duas dimensões, têm distribuições circulares e mínima sobreposição. Na figura 2.2 é mostrada a 14ª iteração do algoritmo, um estado já avançado, após os centroides terem sido inicialmente atribuídos de maneira aleatória.

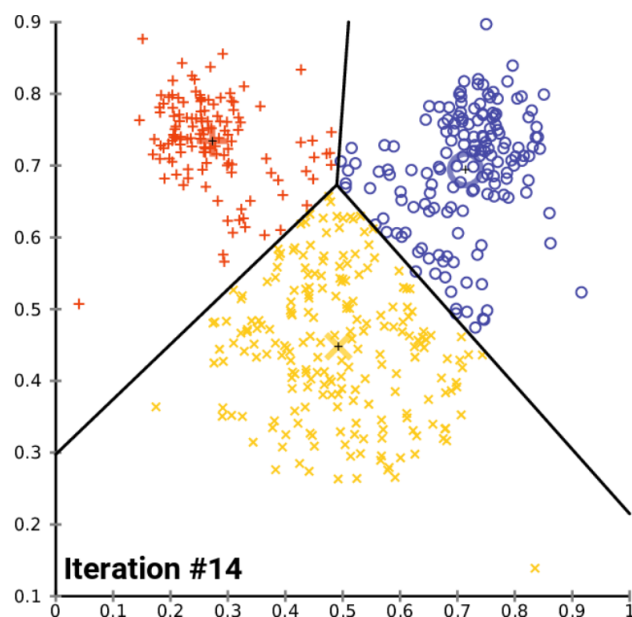


Figura 2.2: [25] Algoritmo K-means com três centroides.

- Modelo mistura - *Fuzzy c-means clustering*: Extensão do algoritmo de *k-means* ao aplicar conceitos de lógica difusa. Aqui é atribuído a todos os pontos um valor de pertença por cada *cluster* existente, sendo que este valor é maior quanto mais perto do centroide o ponto estiver. A este tipo de *clustering* chama-se de *soft* ao invés de *hard* pois não é uma atribuição rígida no sentido em que um ponto pode pertencer, em parte, a dois *clusters* diferentes.
- Modelo mistura - *Expectation-maximization algorithm*(EM): Algoritmo iterativo usado para calcular conjuntos de máxima verosimilhança com base em informação incompleta [26]. É tal como o *c-means*, um algoritmo de *soft clustering* com a diferença de que as funções de pertença optimizam uma matriz de covariância para cada centroide, permitindo assim optimizar distribuições elípticas para dados de duas dimensões. Na figura 2.3 é evidenciável a sobreposição de fronteiras entre o *cluster* vermelho e azul. Nesses pontos, o valor de pertença aos dois grupos é elevado, embora seja categorizado como pertencente a um grupo ou outro.

2.3.2 Aprendizagem supervisionada

Fazem parte desta categoria todos os algoritmos que têm à partida informação sobre valores de entrada e resultados esperados. Alguns destes são:

- Regressão: Com algumas variantes associadas, é um dos algoritmos mais comumente estudados e usado para aproximar os pontos obtidos a uma função. No caso de uma regressão linear os pontos são aproximados a uma função linear (ou a uma soma destas, caso a regressão seja multilinear). Na figura 2.4 está representado um exemplo de regressão linear com a "melhor recta" representada no meio da nuvem de pontos.

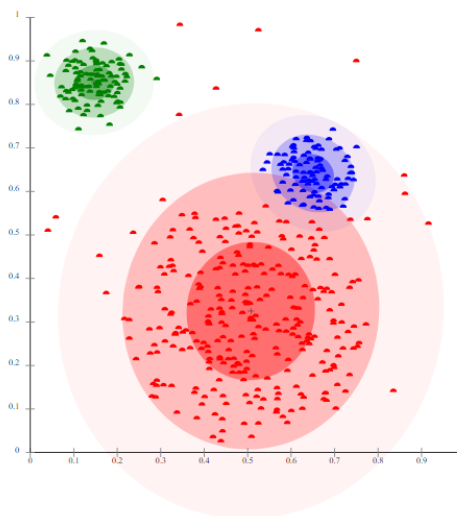


Figura 2.3: [27] Algoritmo EM com modelo gaussiano.

- *Support-vector machine*(SVM): A este algoritmo é dado uma nuvem de dados com os grupos associados para que seja calculada a maior margem entre estes. Esta margem pode ser linear ou não. Na figura 2.5 estão representadas três margens lineares, em que apenas H2 e H3 dividem os dados corretamente e apenas H3 tem a margem ideal.

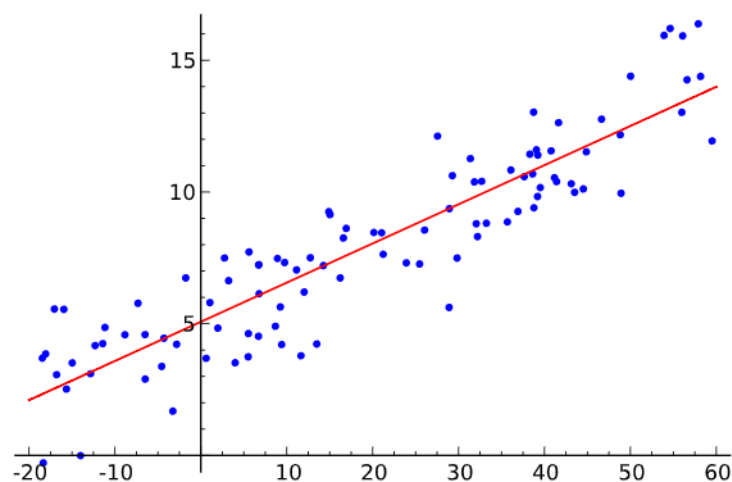


Figura 2.4: [28] Regressão linear.

Invariavelmente, há problemas relacionados com os algoritmos utilizados que requerem a atenção de quem os usa, como é o caso de conjuntos de dados influenciados por erros. Dependendo do tipo de erros, podemos obter pontos singulares com comportamento errático, mas que influenciarão os resultados dos algoritmos negativamente. Este problema pode ser resolvido com uma análise cuidadosa dos dados de forma a excluir valores anormais.

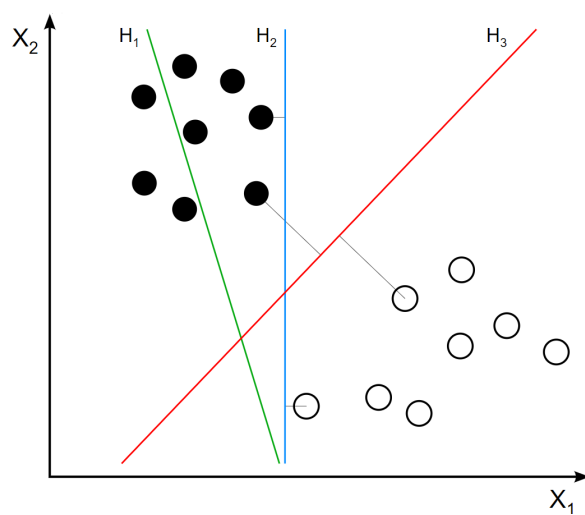


Figura 2.5: [29] SVM com margem linear.

Capítulo 3

Projeto do Sistema

Neste capítulo é descrita a configuração do sistema, *hardware* e *software* utilizados, o protocolo experimental, e o raciocínio que levou a certas decisões serem tomadas.

3.1 Configuração e Protocolo Experimental

As experiências que procuramos elaborar tiveram como base o intervalo de concentrações de cloreto de sódio e glicose mais comumente encontradas no suor. Como tal, foram utilizados valores presentes na tabela da figura 3.1. De notar que o NaCl é um eletrólito forte, razão pela qual faz sentido ter concentrações de Na^+ e de Cl^- em separado. Assim, foram usadas as maiores concentrações de entre os dois iões (sódio). Em contrapartida, a glicose é uma molécula neutra e não se divide naturalmente na presença da água.

Inicialmente, com base nestes valores, foram preparadas e armazenadas amostras com o intuito de analisar cada uma em dias consecutivos. As soluções preparadas foram obtidas através de diluições do soluto até chegar às concentrações encontradas no suor humano. Para isso, foi utilizada água ultra-pura [31], glicose de 0.56 M [32] e o cloreto de sódio de 5 M [33].

Conhecendo os valores de molaridade de ambos os solutos, os volumes usados são calculados a partir da seguinte equação:

$$V_s = \frac{V_f * M_f}{M_s} \quad (3.1)$$

Na qual V_s e M_s são o volume (L) e molaridade do soluto (mol/L), e V_f e M_f são volume (L) e molaridade da solução final (mol/L). A título de exemplo, se a molaridade requerida for a concentração média de NaCl que se pode encontrar no suor ($M = 310 \text{ mmol/L}$), então para encher uma cubeta com 4 mL seria preciso 248 μL de soluto:

$$\begin{aligned} V_s &= \frac{4\text{mL} * 310\text{mmol/L}}{5\text{mol/L}} \\ \Leftrightarrow V_s &= 248\mu\text{L} \end{aligned} \quad (3.2)$$

Constituents ^a	Median concentration (M)	Minimum concentration (M)	Maximum concentration (M)
<i>Primary electrolytes</i>			
Sodium	3.1×10^{-2}	1.1×10^{-4}	3.9×10^{-1}
Chloride	2.3×10^{-2}	1.7×10^{-5}	2.8×10^{-1}
Calcium	5.2×10^{-3}	4.7×10^{-6}	1.5×10^{-2}
Potassium	6.1×10^{-3}	6.7×10^{-6}	3.8×10^{-2}
Magnesium	8.2×10^{-5}	7.4×10^{-8}	3.8×10^{-3}
Phosphate	3.1×10^{-4}	2.3×10^{-5}	1.1×10^{-3}
Bicarbonate	3.0×10^{-3}	2.6×10^{-4}	2.0×10^{-2}
<i>Ionic constituents</i>			
Sulfate	4.2×10^{-4}	7.0×10^{-5}	2.0×10^{-3}
Sulfur	2.3×10^{-3}	2.2×10^{-4}	2.3×10^{-3}
Fluoride	1.1×10^{-5}	5.8×10^{-8}	9.5×10^{-5}
Phosphorous	1.3×10^{-5}	2.2×10^{-8}	1.5×10^{-3}
Bromine	2.3×10^{-6}	4.4×10^{-9}	6.3×10^{-6}
Cadmium	1.8×10^{-8}	1.2×10^{-8}	2.3×10^{-8}
Copper	9.4×10^{-7}	1.3×10^{-8}	1.2×10^{-3}
Iodide	7.1×10^{-8}	7.9×10^{-11}	7.5×10^{-5}
Iron	9.8×10^{-6}	1.5×10^{-8}	1.1×10^{-3}
Lead	1.2×10^{-7}	3.5×10^{-9}	2.0×10^{-7}
Manganese	1.1×10^{-6}	1.1×10^{-9}	1.3×10^{-3}
Nickel	4.2×10^{-7}	1.7×10^{-9}	8.3×10^{-7}
Zinc	1.3×10^{-5}	1.4×10^{-8}	2.3×10^{-5}
Lactic acid	1.4×10^{-2}	3.7×10^{-3}	5.0×10^{-2}
Pyruvic acid	1.8×10^{-4}	1.0×10^{-7}	1.0×10^{-3}
Butyric acid	2.4×10^{-6}	5.0×10^{-7}	6.0×10^{-6}
Acetic acid	1.3×10^{-4}	5.9×10^{-5}	4.2×10^{-4}
Hexanoic acid	9.0×10^{-7}	2.0×10^{-7}	3.5×10^{-6}
Propionic acid	3.5×10^{-6}	1.2×10^{-6}	7.4×10^{-6}
Isobutyric acid	8.0×10^{-7}	NR ^b	2.8×10^{-6}
Isovaleric acid	1.1×10^{-6}	2.0×10^{-7}	4.5×10^{-6}
Glucose	1.7×10^{-4}	5.6×10^{-6}	2.2×10^{-3}

Figura 3.1: [30] Tabela de concentrações de alguns constituintes encontrados no suor.

O armazenamento de soluções provou-se infrutífero por baixa reprodutibilidade dos resultados, muito provavelmente devido a contaminações nos frascos onde eram guardadas as amostras, ou fraco isolamento provido pelos mesmos. Ainda assim, o cloreto de sódio deu sempre resultados que implicavam uma relação linear, enquanto que a glicose parecia dar resultados erráticos. Isto requereu que o método de produção das amostras fosse modificado.

Experimentalmente ficou provado que a imiscibilidade das amostras pedia um tratamento diferente das mesmas. A glicose é imiscível em água e é de maior densidade, o que significa que a mistura não é homogênea em repouso. Experimentalmente foi possível notar uma diferença acentuada entre a refletância logo após agitar a amostra e alguns minutos depois. Devido a isso, o procedimento levado a cabo nos testes incluiu uma fase de repouso da amostra, numa tentativa de aumentar a reprodutibilidade dos dados. Assumindo que a glicose acabaria por se concentrar no fundo da cubeta por convecção, devido à sua densidade ser superior à da água, esperar mais tempo iria diminuir a quantidade em suspensão até chegar a um equilíbrio, no qual os resultados obteriam máxima reprodutibilidade. Já o NaCl é miscível, pelo que é benéfico misturar bem com a água de forma a obter uma solução o mais homogênea possível.

As amostras de NaCl foram criadas individualmente e armazenadas em potes de vidro com tampa de plástico e que permitiam uma boa mistura. Numa tentativa de diminuir influências externas, e como não beneficiam de uma boa mistura, as amostras de glicose foram preparadas diretamente na cubeta, para a qual se aumentava a concentração gradualmente. Isto era feito tirando uma parte do volume da cubeta e acrescentando soluto concentrado na mesma quantidade. Este processo pode introduzir erros quanto à concentração da solução preparada na cubeta, visto

à mistura não ser homogênea. Ainda assim, usando este método é garantido um aumento da concentração, pois o volume retirado tem sempre concentração menor à do soluto.

Usando este método, a concentração final da solução pode ser calculada através da seguinte fórmula:

$$M = \frac{n_1 + n_2}{V_1 + V_2} \quad (3.3)$$

Na qual M é a molaridade da solução resultante em mol/L, V_k é o volume de substância k , e n_k é a quantidade molar da substância k presente nesse volume.

Assim, tendo escolhido o valor de $420 \mu\text{mol/L}$ para iniciar o teste com uma solução diluída de glicose, que será o mínimo de concentração usado, e fazendo a permuta de $5 \mu\text{L}$ de solução com soluto a cada iteração, podemos saber qual é a próxima concentração usada da seguinte forma:

$$\begin{aligned} M &= \frac{(0.56\text{mol/L} * 5\mu\text{L}) + (420\mu\text{mol/L} * 3.995\text{mL})}{5\mu\text{L} + 420\mu\text{L}} \\ \Leftrightarrow M &= 1.119\text{mmol/L} \end{aligned} \quad (3.4)$$

Foi testada experimentalmente a sensibilidade do sistema para as amostras utilizadas e concluiu-se que se a amostra estiver muito longe do conjunto fotorrecetor + fotodíodo, não são perceptíveis alterações significativas nos resultados. Desta forma, todas as experiências foram feitas com a mesma quantidade de solução de 4 mL (aproximadamente 1cm de distância entre a amostra e o sensor).

Neste projeto foram utilizados dois LEDs com emissão luminosa em diferentes comprimentos de onda, com a antecipação de que para cada uma destas surgisse um diferente valor associado à intensidade da luz refletida da solução e que pudesse ser correlacionado com a concentração das amostras. Para obter mais dados por amostra, a execução do programa conta com uma modelação da intensidade da luz irradiada através da densidade de pulsos, que aumenta ao longo do tempo até um máximo pré-definido. Como forma de melhorar a relação sinal-ruído (SNR), a resposta correspondente a cada nível de intensidade é medida 20 vezes e o valor que é exportado corresponde à média dos resultados. O controlo do nível de intensidade é discutido em detalhe no capítulo 3.2.

O objetivo do sistema será o de encontrar pequenas variações de concentrações em amostras, tal como foi explicado em 2.1. Desta forma, foi adotado um procedimento já utilizado no laboratório do BRAIN. São usadas cubetas de vidro, para conter as amostras em análise, envolvidas numa estrutura impressa de PLA preto (forma de prisma retangular). Ao escolher PLA preto estamos a diminuir as reflexões que não são provocadas diretamente pela amostra. Com o uso desta estrutura, é também garantido que a cubeta não se move, o que poderia introduziria um fator de incerteza nas medições. Da mesma forma, para diminuir erros externos, é de evitar que o sensor se mova, razão pela qual foi projetada e impressa uma tampa, também de PLA preto, para alojar o sensor e encaixar no resto da estrutura. Com esta configuração (figura 3.2) ficou assegurado que a

radiação do sensor incide diretamente sobre as amostras, e não através do vidro da cubeta.

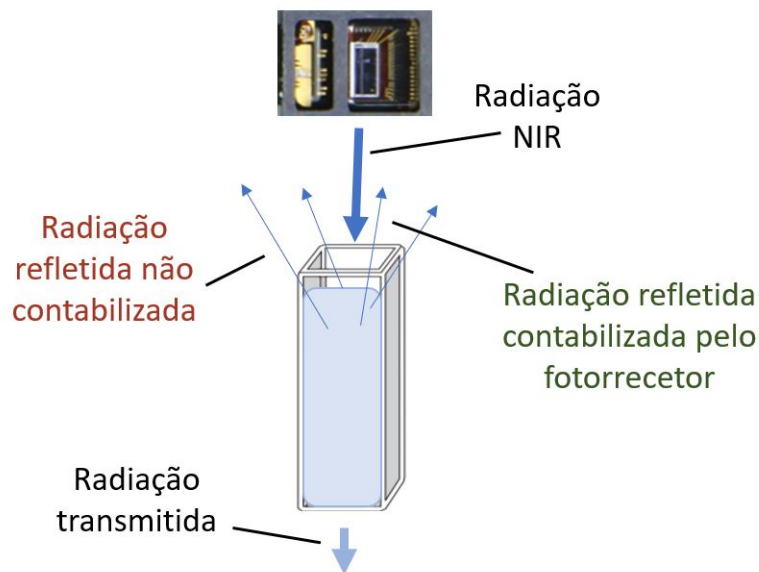


Figura 3.2: Esquema da configuração usada.

Como se pode ver pelas figuras 3.3 e 3.4, a estrutura em PLA torna o sistema sensor + cubeta praticamente fechados ao exterior, prevenindo que a luz ambiente seja captada pelos fotorreceptores.

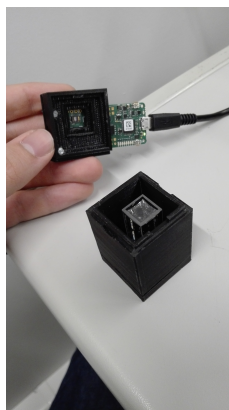


Figura 3.3: Configuração sensor + amostra.



Figura 3.4: Estrutura impressa com sensor.

A cubeta utilizada, de modo a não ser um fator que influencie significativamente os nossos resultados, é feita de vidro óptico especial (número 3 – *SOG* – 10 [34]), que segundo o vendedor, Starna, tem uma faixa utilizável de comprimento de onda de 320 nm a 2500 nm, o que inclui os que são utilizados. Isto significa que o vidro é altamente transparente nesta gama de comprimentos de onda.

3.2 Placa de Desenvolvimento

Foi utilizada a placa de desenvolvimento AnalogMax - ADI Sensor Hub, a qual inclui o sensor ótico ADPD188BI da Analog Devices. Este sensor foi projetado como um detetor ótico de fumo, por aplicação de princípios da espectroscopia. Com recurso a dois LEDs de luz pulsada - um de luz azul (470 nm) e um de infra-vermelhos (850 nm) - e dois fotorreceptores (1.2 mm² de área ativa conjunta), é capaz de medir a luz incidente, que em condições ideais seria luz refletida proveniente unicamente de partículas da amostra. A placa foi escolhida devido a várias razões, a seguir numeradas:

1. Inclusão de dois LEDs de diferentes comprimentos de onda,
2. FPGA com processador programável em C,
3. Programação mais alto nível em Python num Jupyter Notebook,
4. Pequenas dimensões,
5. Custo relativo baixo.

Com o uso de dois LEDs diferentes espera-se analisar a resposta de diferentes amostras para cada comprimento de onda e tentar encontrar valores de referência para os mesmos. São utilizados dois para tentar obter uma maior discriminação nas amostras analisadas. As frequências utilizadas, estando na região NIR do espectro, são perto das ideais [4], na medida em que a água tem relativamente pouca influência nos resultados, por absorver pouca radiação comparativamente com outras zonas do espectro [15][35].

Na placa usada, além do sensor, existe uma FPGA da Intel que inclui um processador *soft-core* (NIOS II), que pode ser programado usando a linguagem C. Nessa mesma interface há código que permite a obtenção de instruções por USB, as quais são traduzidas e enviadas para o sensor por I²C. As instruções obtidas por USB são, por sua vez, criadas e enviadas por um programa em Python, usando a biblioteca "serial" e executado num Jupyter Notebook.

Usando o Jupyter Notebook foi possível uma estruturação do código que se divide em inicialização de variáveis/definição de funções, e o código principal, onde se faz o processamento dos dados recolhidos. Estes dados são exportados para o Microsoft Office Excel de forma automática com recurso à biblioteca Openpyxl, onde são analisados graficamente. Este comportamento está ilustrado na figura 3.5.

O código usado para a inicialização e comunicação com o sensor foi fornecido pelo fabricante da placa, ao qual foram feitas algumas modificações, nomeadamente quanto à potência fornecida aos LEDs e quanto ao ganho dos amplificadores de trans-impedância (TIA), responsáveis por amplificar o sinal recebido antes de ser quantizado. Estas mudanças foram necessárias visto que os fotorreceptores têm uma gama dinâmica direcionada para intensidades luminosas inferiores nas suas condições normais. A intensidade luminosa do sinal refletido é muito elevada, o que significa

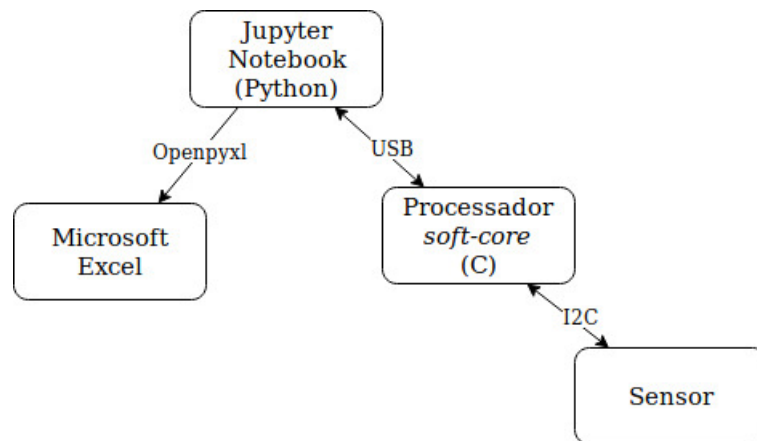


Figura 3.5: Fluxo de dados do sistema.

que o sinal medido, usando a configuração original, saturava o ADC do sensor, diminuindo a relação sinal-ruído do sinal adquirido, e consecutivamente a qualidade dos dados obtidos. Como tal, foram aplicadas duas modificações ao funcionamento do sensor, de ajuste à gama dinâmica:

1. Diminuição da potência fornecida aos LEDs,
2. Diminuição da resistência de *feedback* dos TIAs.

Na figura 3.6, o ajuste da gama dinâmica foi conseguido através da diminuição da corrente fornecida aos LEDs, nos nós V_{blue} e V_{ir} , para 10% da nominal, ao ativar "*low power mode*" no sensor. Foi também diminuída a resistência de *feedback* dos amplificadores onde estão ligados os fotorreceptores (na figura chamados PDET), para 25K Ω para o LED de luz azul e 100K Ω para o de luz infra-vermelha, valores ajustados consoante a intensidade luminosa refletida esperada de cada LED. Desta forma é possível obter mais dados estatisticamente significativos, já que os fotorreceptores não chegam ao ponto de saturação com a mesma facilidade. O sensor funciona iluminando a amostra sequencialmente com dois LEDs com comprimentos de onda diferentes. A luz recebida nos fotorreceptores é então convertida para corrente elétrica. Este sinal é amplificado e filtrado por um filtro passa-banda antes de ser quantizado num ADC (Conversor Analógico-Digital) de 14 bits.

A melhoria na gama dinâmica representa uma melhoria no SNR do sinal e permite-nos observar a resposta das amostras a diferentes níveis de intensidade do sinal. Com isto, foi aplicada uma *Pulse Density Modulation* (PDM), fazendo variar o número de pulsos que os LEDs emitem, que pode ser de qualquer número entre 1 e 255. Do ponto de vista físico, a intensidade e o número de pulsos estão interligados, pois um maior número de pulsos pode ser visto como mais fótons a serem emitidos. É esperado que o número de fótons refletidos seja proporcional aos enviados.

A figura 3.7 foi baseada no diagrama do capítulo "Dual Time Slot Operation" da *datasheet* do sensor [36] e ilustra o diagrama temporal do seu funcionamento, onde n_A e n_B são o número de pulsos de cada LED, no primeiro e segundo intervalo de tempo t_A e t_B , e t_1 e t_2 corresponde ao

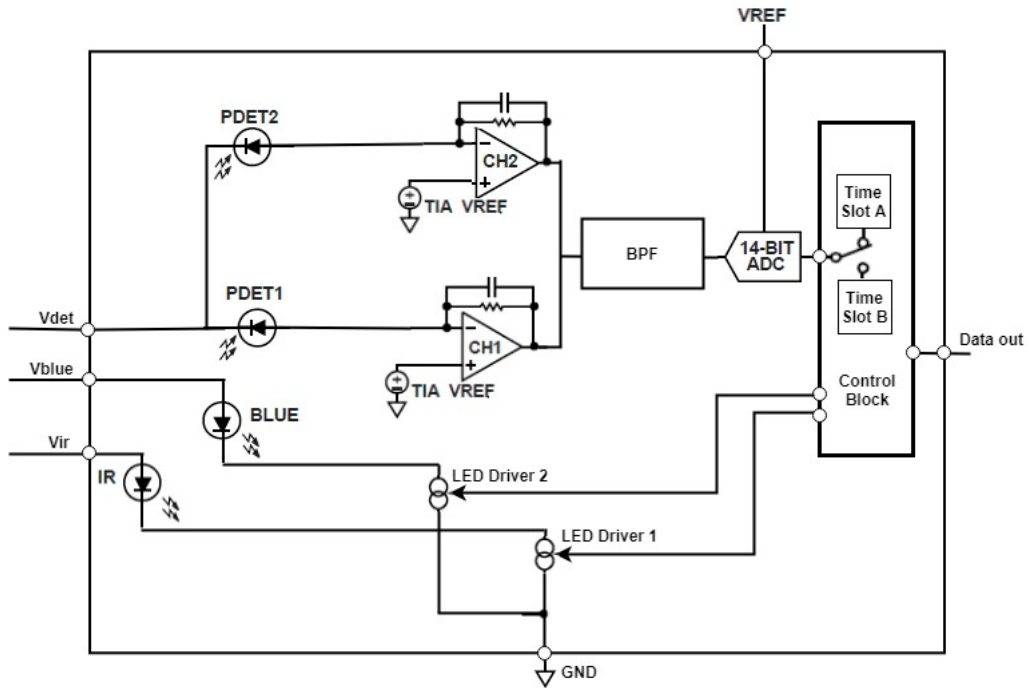


Figura 3.6: Diagrama de blocos do sensor (simplificado).

tempo que demora a processar os resultados de t_A e t_B , respectivamente. É usada uma frequência de amostragem (f_{sample}) de 100 Hz.

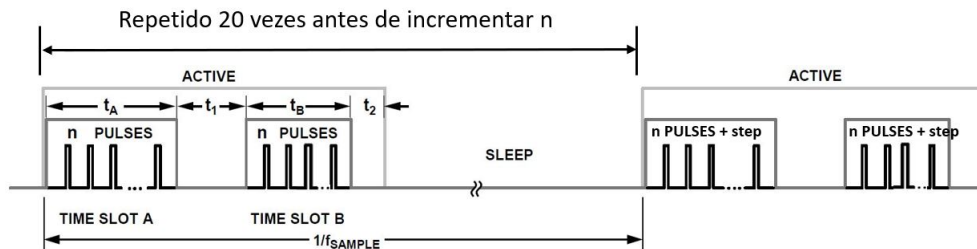


Figura 3.7: Diagrama de funcionamento do sensor com 2 LEDs ativos.

No programa produzido, cada amostra é avaliada 20 vezes por nível de intensidade, que por sua vez é crescente sob um degrau que é customizável. Se o degrau utilizado foi de 16, a começar com 8 pulsos, a solução será amostrada 20 vezes com 8 pulsos de cada LED, seguido de 24, seguido de 40 e assim sucessivamente.

Os dados recolhidos do sensor são diretamente proporcionais à corrente à saída dos fotoreceptores (multiplicado por um fator do ganho do TIA), que por sua vez é dependente da intensidade luminosa que lhes incide. Usando os valores de iluminância de saturação providos pela datasheet do sensor, é possível obter uma boa aproximação para a iluminância captada, em Lux. A conversão entre dados RAW e iluminância será feita com recurso à equação 3.5, assumindo uma relação linear entre ambos, tendo em atenção que o ganho do TIA é diferente para ambos os LEDs.

$$I = 13k \frac{25k\Omega}{R_T} \frac{I_{RAW}}{4} \quad [\text{Lux}] \quad (3.5)$$

Onde 13k é a iluminância máxima discernível pelo sensor, 25k é a resistência mínima do TIA, R_T é a resistência que está a ser usada no TIA, I_{RAW} é o valor obtido do sensor e 4 é o valor máximo que se pode obter (saturação), após divisão por uma constante.

Capítulo 4

Discussão e Resultados

Como descrito anteriormente, usou-se glicose e cloreto de sódio em concentrações próximas das que se encontram no suor, de forma a avaliar se este sensor, com a técnica utilizada, pode ser usado para distinguir diferentes concentrações e se há reprodutibilidade nos resultados obtidos.

Os gráficos a seguir representam a resposta de diferentes concentrações de glicose quando é incidida luz IV e azul com uma intensidade constante equivalente a 104 pulsos do LED (e 10% da potência fornecida). Este número de pulsos é arbitrário e escolhido por não saturar o ADC mas já ter um fluxo luminoso apreciável. Tal como já foi referido, a intensidade dos LEDs é também dependente dos amplificadores de transimpedância (TIA). O valor da sua resistência é de 25k Ω para o LED azul e de 100k Ω para o LED IV. A refletância fica assim diretamente relacionada com a iluminância por uma constante de proporcionalidade.

A glicose apenas foi testada para valores superiores aos médios encontrados no suor, pois para obter volumes tão pequenos já seria necessário fazer uma dupla diluição, que devido à imiscibilidade da glicose com a água, tornava o valor real das concentrações pouco preciso. Foram também testadas concentrações superiores à esperada em [30], como estudo do comportamento do sensor para valores mais elevados de glicose.

Nos gráficos das figuras 4.1 e 4.2 encontramos dados de dois dias diferentes¹: os dados representados a azul foram retirados num dia em que a temperatura ambiente foi de 23° Celsius e naquele representado a vermelho de 21° Celsius. Estes são dados recolhidos já tendo em conta a imiscibilidade da glicose, onde entre cada amostragem foi esperado entre três a cinco minutos, com especial atenção a isso no conjunto de dados a vermelho.

Ainda assim, como se pode ver, não há uma grande distinção para os diferentes valores da glicose nas concentrações testadas, embora pareça haver uma pequena tendência para que a intensidade da luz IV refletida seja menor com o aumento da concentração e maior quando incidida pela luz azul.

Verificou-se noutros trabalhos como em [37] e [38] uma tendência para que a intensidade da luz refletida descesse com o aumento da concentração, embora para comprimentos de onda diferentes. É possível que a fraca resposta da glicose se deva a um efeito chamado *water displacement*,

¹ Gráficos não estão à escala.

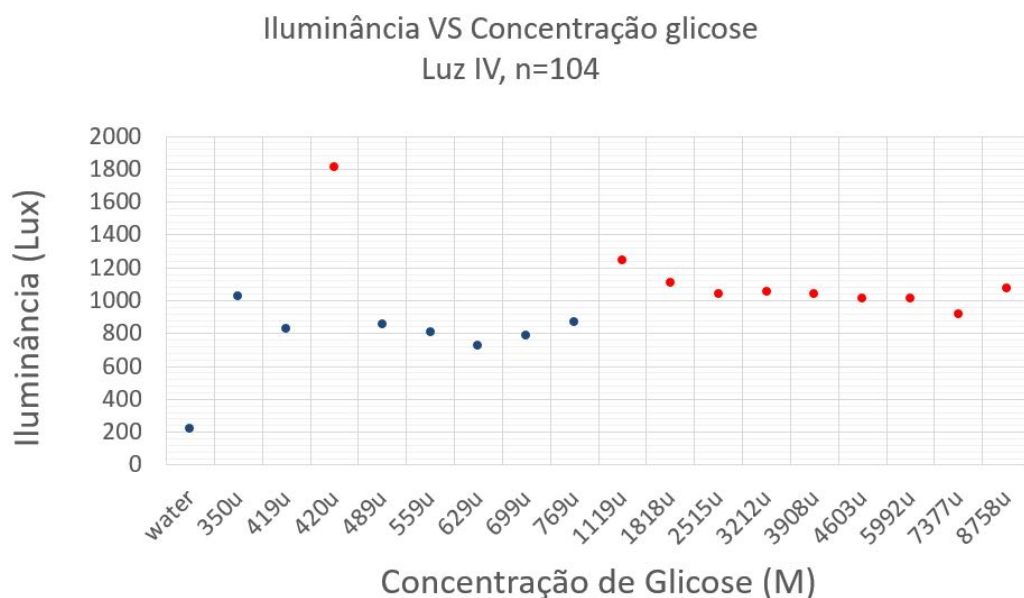


Figura 4.1: Resposta da glicose à luz IV para uma intensidade de 104 pulsos.

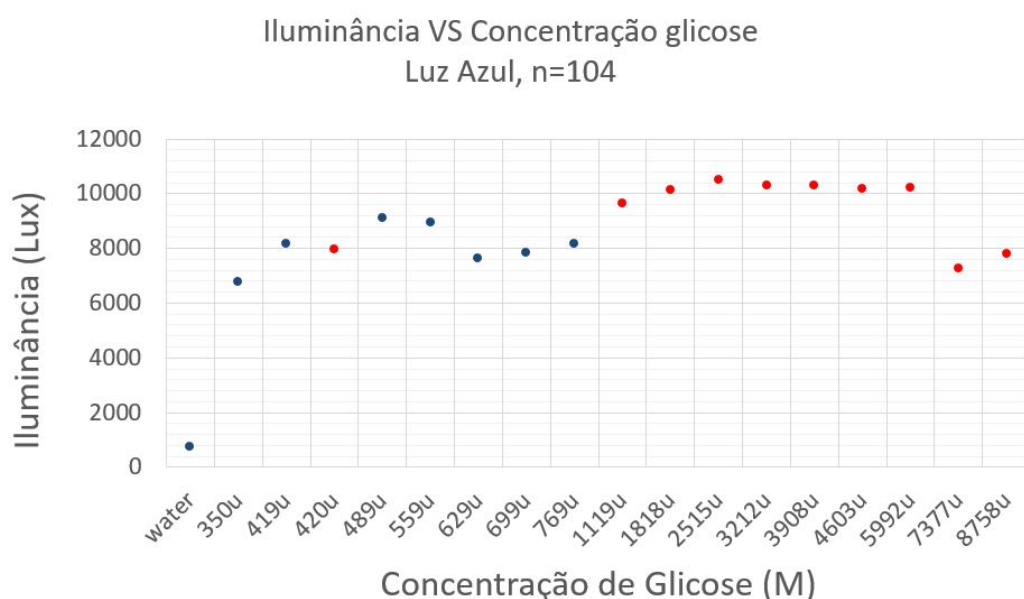


Figura 4.2: Resposta da glicose à luz azul para uma intensidade de 104 pulsos.

responsável na espectroscopia de absorção pelo efeito contrário ao esperado [39]. Devido à forma como a glicose interage com a água, a absorvância diminui com o aumento da concentração. É uma grandeza que não se compara facilmente com a refletância, mas a mudança no comportamento da solução poderá ser transversal.

Já o coeficiente de reflexão do cloreto de sódio mostrou uma clara dependência com a concentração. Usando luz azul há uma tendência de maior reflexão com o aumento da concentração do soluto, que parece ser o resultado esperado, seguindo a equação 2.5. No entanto, para radia-

ções IV parece ocorrer o oposto. De notar que os dados da figura 4.3 foram recolhidos sem que tivesse havido modificação do ganho do TIA, razão pela qual saturam mais rapidamente. O gráfico equivalente para a luz azul foi excluído por essa razão - apenas para um número de pulsos muito reduzido o seu valor era diferente do valor de saturação. As figuras 4.4 e 4.5 já mostram os resultados com os ganhos anteriormente descritos. Estes foram recolhidos a uma temperatura ambiente de 23° Celsius e para a 4.3 era de 22° Celsius².

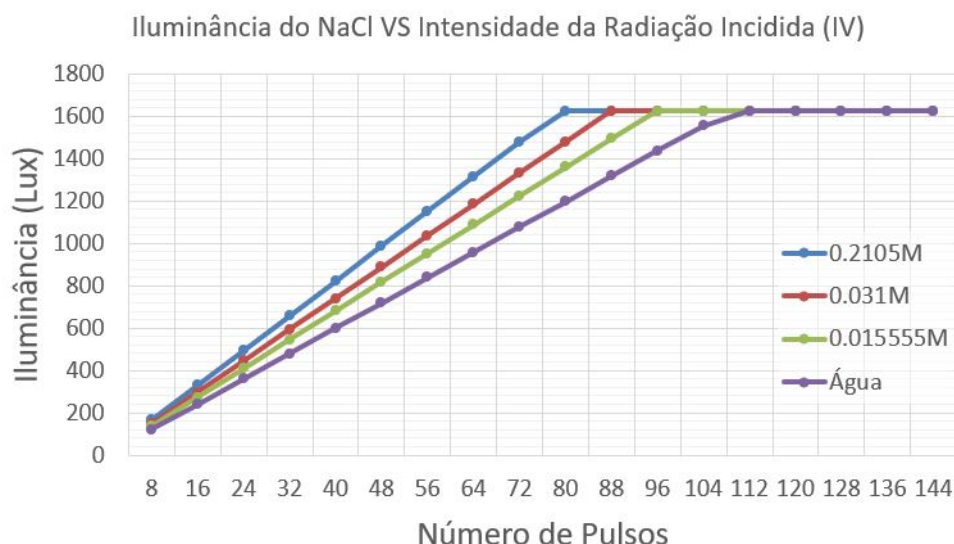


Figura 4.3: Resposta de diferentes concentrações de NaCl à luz IV ($R_{TIA}=200k\Omega$).

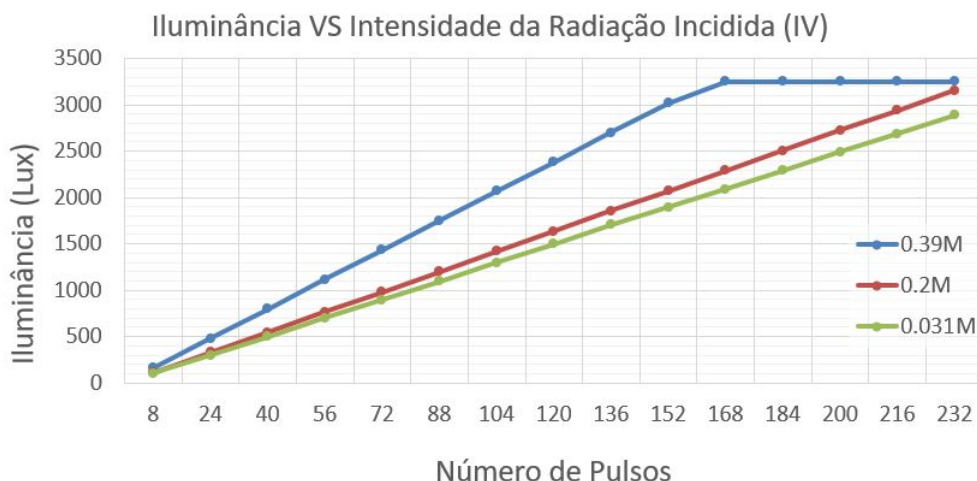


Figura 4.4: Resposta de diferentes concentrações de NaCl à luz IV.

Nestes gráficos do NaCl é possível ver que para diferentes concentrações da mesma substância, a resposta em função da intensidade é linear mas com uma proporcionalidade que aumenta com a

²Gráficos não estão à escala.

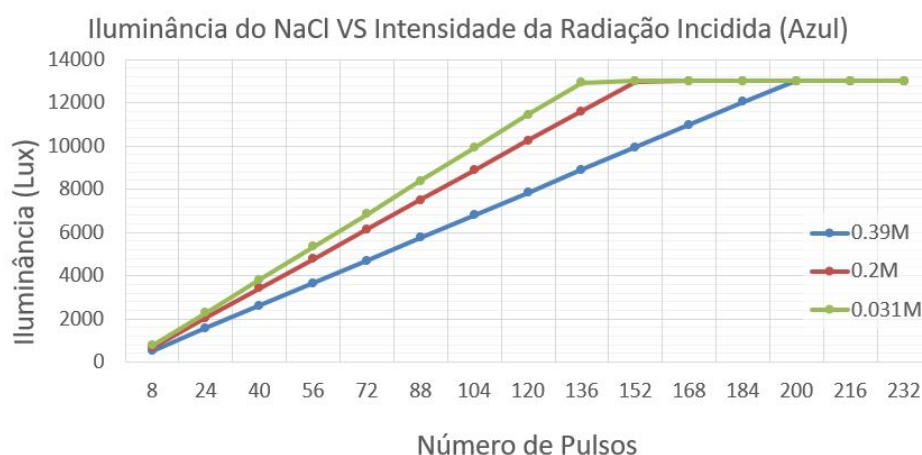


Figura 4.5: Resposta de diferentes concentrações de NaCl à luz azul.

concentração. De forma a entender melhor este fenómeno foi calculado o declive (m) dos gráficos 'Iluminância vs Número de pulsos' para as diferentes concentrações, recorrendo ao método de regressão linear do excel. O gráfico da figura 4.6 mostra a iluminância em função da concentração de NaCl para uma intensidade constante e igual à utilizada nas figuras 4.1 e 4.2, que pode ser usada para comparação. Na figura 4.7 é possível ver a derivada respetiva, onde é aparente a existência de proporcionalidade na mesma razão.

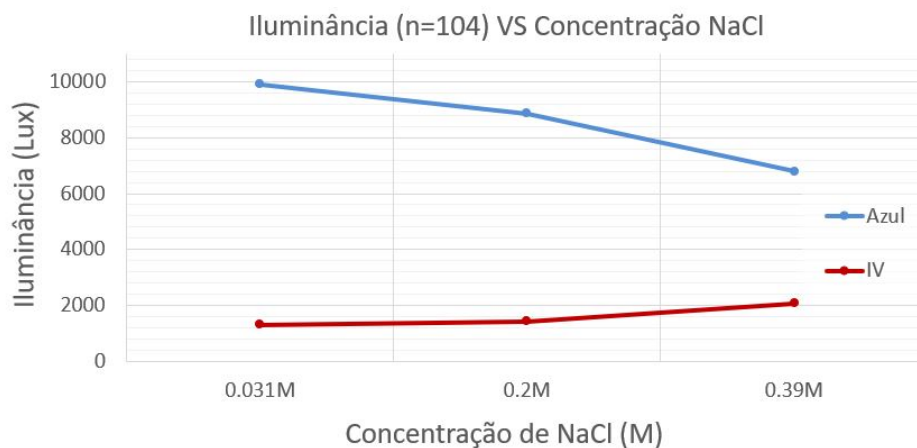


Figura 4.6: Iluminância em função da concentração de NaCl com incidência de $n=104$ pulsos.

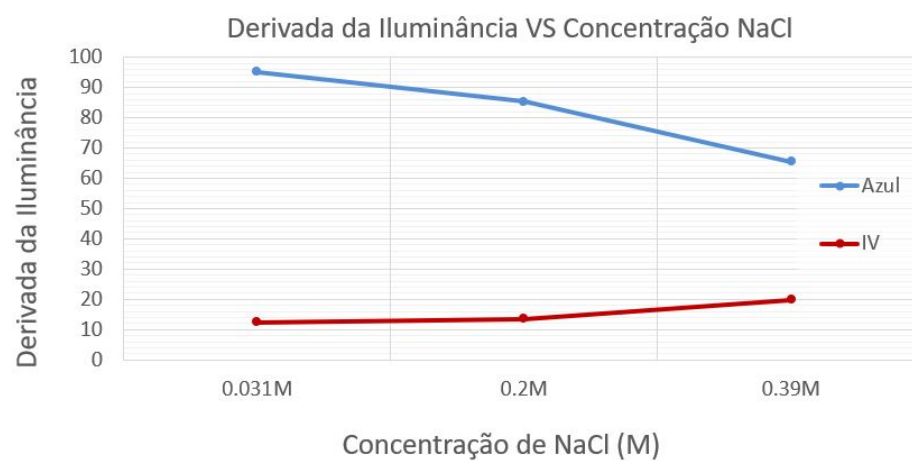


Figura 4.7: Derivada da iluminância em função do número de pulsos para diferentes concentrações de NaCl.

Capítulo 5

Conclusões e Trabalho Futuro

Neste capítulo são apresentadas as conclusões do trabalho efetuado até agora, assim como uma comparação dos objetivos inicialmente delineados para o projeto e trabalho a ser desenvolvido no futuro.

5.1 Satisfação dos Objetivos

O sensor ótico direcionado para a detecção de fumos foi adaptado com sucesso para ser testado em líquidos, que por serem mais densos têm capacidade de refletir muito mais que gases. A partir daqui, foi estudada a possibilidade de usar este tipo de sensor como um detetor e quantificador da concentração de substâncias como a glicose e o cloreto de sódio.

Os resultados mostram que embora seja possível observar experimentalmente algumas das relações que estão previstas na teoria, a medição da concentração de substâncias utilizando o método proposto não é trivial e tem fraca reprodutibilidade. Isto deve-se a diversos fatores que foram identificados e que vão desde a temperatura ambiente e a temperatura do sensor (que vai aumentando com o tempo de funcionamento), até erros na criação das amostras ou contaminação das mesmas, que por se tratar de volumes tão reduzidos de soluto, pode ter grande impacto nas medições.

5.2 Trabalho Futuro

A fraca reprodutibilidade dos resultados faz indicar que ainda há bastante trabalho pela frente. Depois dos problemas inerentes ao sistema serem resolvidos, passa a haver a possibilidade de aplicar técnicas de *machine-learning* aos resultados obtidos para ter um grande intervalo de confiança.

Posteriormente, poderia ser interessante tentar aplicar os testes a amostras mais complexas, com mais do que um constituinte, e variando as suas concentrações. Este seria um passo fundamental para tentar estudar compostos biológicos como o suor, embora conseguir isto possa ser complicado sem usar modulação por frequência.

O uso de uma estrutura diferente para segurar uma amostra de volume mais reduzido também pode ser interessante. Recorrendo a um recipiente como um vidro de relógio em vez da cubeta, talvez fosse possível obter dados estatisticamente significativos usando uma quantidade de substância muito menor e mais parecida com o que se obteria aplicado a *wearables*.

Numa fase posterior, tendo sido encontrados intervalos de confiança aceitáveis, toda a lógica que está a ser executada em Python no Jupyter Notebook poderia ser facilmente passado para C e ser executado no NIOS II da FPGA.

Por fim, o objetivo final seria a criação de uma versão comercializável de um dispositivo capaz de usar suor real e daí extrair informações. No entanto, isto levantaria problemas como a variação das propriedades do suor com base no indivíduo e do meio, pelo que a criação de uma malha de controlo seria necessária.

Anexo A

Estrutura impressa

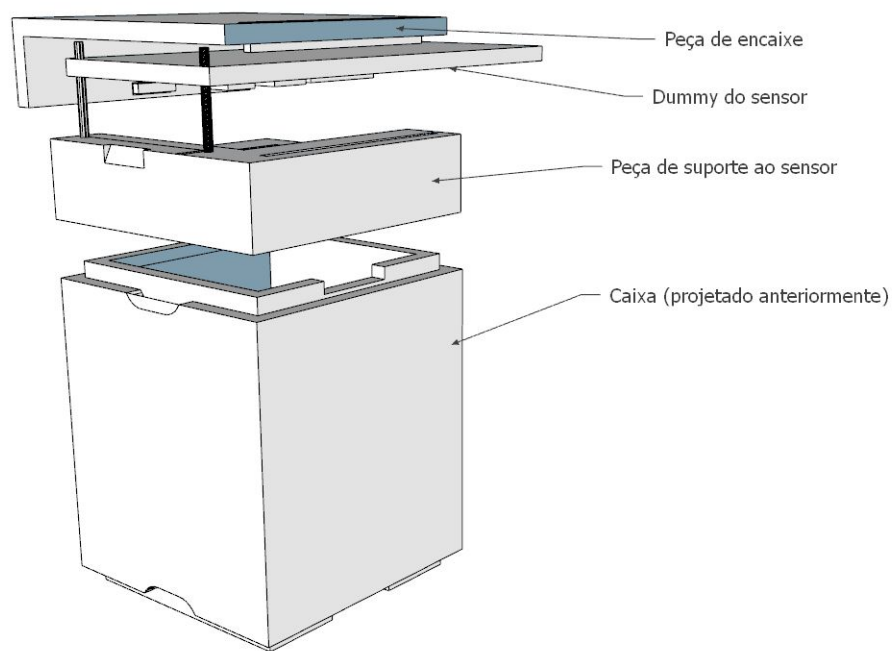


Figura A.1: Estrutura impressa produzida em Sketchup.

Bibliografia

- [1] Roger N Clark. *Spectroscopy of Rocks and Minerals and Principles of Spectroscopy. Manual of Remote Sensing*. Vol. 3. 1999, pp. 3–58. ISBN: 0471294055.
- [2] James Moyer et al. “Correlation Between Sweat Glucose and Blood Glucose in Subjects with Diabetes”. Em: *Diabetes Technology & Therapeutics* 14.5 (2012), pp. 398–402. ISSN: 1520-9156. DOI: [10.1089/dia.2011.0262](https://doi.org/10.1089/dia.2011.0262). URL: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/dia.2011.0262>.
- [3] R. M. Morgan, M. J. Patterson e M. A. Nimmo. “Acute effects of dehydration on sweat composition in men during prolonged exercise in the heat”. Em: *Acta Physiologica Scandinavica* 182.1 (2004), pp. 37–43. ISSN: 00016772. DOI: [10.1111/j.1365-201X.2004.01305.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-201X.2004.01305.x).
- [4] J. Mark Parnis e Keith B. Oldham. “Beyond the beer-lambert law: The dependence of absorbance on time in photochemistry”. Em: *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 267 (2013), pp. 6–10. ISSN: 10106030. DOI: [10.1016/j.jphotochem.2013.06.006](https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2013.06.006). URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotochem.2013.06.006>.
- [5] Luís Spencer Lima. “Lei de Lambert Beer”. Em: *Revista de Ciência Elementar* 1.1 (2017), pp. 1–2. ISSN: 2183-1270. DOI: [10.24927/rce2013.047](https://doi.org/10.24927/rce2013.047).
- [6] A Mehta. *Ultraviolet-Visible (UV-Vis) Spectroscopy – Limitations and Deviations of Beer-Lambert Law Real Limitation and Deviation of Beer-Lambert Law Chemical Deviations and Limitations to Beer-Lambert Law*. 2012. URL: <https://pharmaxchange.info/2012/05/ultraviolet-visible-uv-vis-spectroscopy-%E2%80%93-limitations-and-deviations-of-beer-lambert-law/>.
- [7] Melchor C. Pasikatan et al. “Near infrared reflectance spectroscopy for online particle size analysis of powders and ground materials”. Em: *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 9.3 (2001), pp. 153–164. ISSN: 09670335. DOI: [10.1255/jnirs.303](https://doi.org/10.1255/jnirs.303).
- [8] J. Militký. “Fundamentals of soft models in textiles”. Em: *Soft Computing in Textile Engineering*. 2011.
- [9] B. Stuart e Series Preface. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. Vol. 8. 2004, pp. 1–13. ISBN: 0470854278.

- [10] R. N. Clark e T. L. Roush. “Reflectance spectroscopy: quantitative analysis techniques for remote sensing applications.” Em: *Journal of Geophysical Research* 89.B7 (1984), pp. 6329–6340. ISSN: 01480227. DOI: [10.1029/JB089iB07p06329](https://doi.org/10.1029/JB089iB07p06329). URL: <https://doi.org/10.1029/JB089iB07p06329>.
- [11] Andor Technology. “Absorption / Transmission / Reflection Spectroscopy”. Em: (). URL: <http://www.andor.com/learningpdf.aspx?id=45>.
- [12] Nanophoton Corporation. *Intracellular Distribution of Cholesterol*. URL: <https://www.nanophoton.net/applications/bio/cholesterol>.
- [13] Luis Galvez-Sola et al. “Rapid estimation of nutritional elements on citrus leaves by near infrared reflectance spectroscopy”. Em: *Frontiers in Plant Science* 6.July (2015), pp. 0–8. DOI: [10.3389/fpls.2015.00571](https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00571).
- [14] H. Riris et al. “Design of an open path near-infrared diode laser sensor: application to oxygen, water, and carbon dioxide vapor detection”. Em: *Applied Optics* 33.30 (1994), p. 7059. ISSN: 0003-6935. DOI: [10.1364/ao.33.007059](https://doi.org/10.1364/ao.33.007059). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20941257>.
- [15] Yookyung Kim, Mukti Singh e Sandra E. Kays. “Near-infrared spectroscopy for measurement of total dietary fiber in homogenized meals”. Em: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54.2 (2006), pp. 292–298. ISSN: 00218561. DOI: [10.1021/jf051975b](https://doi.org/10.1021/jf051975b).
- [16] Stephen F. Malin et al. “Noninvasive prediction of glucose by near-infrared diffuse reflectance spectroscopy”. Em: *Clinical Chemistry* 45.9 (1999), pp. 1651–1658. ISSN: 00099147.
- [17] Siemens Healthineers. *ADVIA 120 Hematology System*. URL: <https://www.siemens-healthineers.com/pt/hematology/systems/advia-120-hematology-system/technical-specifications>.
- [18] S. Ramasahayam et al. “FPGA based system for blood glucose sensing using photoplethysmography and online motion artifact correction using adaline”. Em: *2015 9th International Conference on Sensing Technology (ICST)*. Dez. de 2015, pp. 22–27. DOI: [10.1109/ICSensT.2015.7438358](https://doi.org/10.1109/ICSensT.2015.7438358).
- [19] Cystic Fibrosis Foundation. *Sweat Test*. URL: <https://www.cff.org/What-is-CF/Testing/Sweat-Test/>.
- [20] S Brady et al. “Wearable Sensors? What is there to sense?” Em: (2005). URL: <https://experts.umn.edu/en/publications/wearable-sensors-what-is-there-to-sense>.
- [21] Fernando Benito-Lopez et al. ““Sweat-on-a-chip”: Analysing sweat in real time with disposable micro-devices”. Em: *Proceedings of IEEE Sensors* (2010), pp. 160–163. DOI: [10.1109/ICSENS.2010.5690681](https://doi.org/10.1109/ICSENS.2010.5690681).
- [22] Gengchen Liu, Nate Slappey e Samuel Snelgrove. “A wearable conductivity sensor for wireless real-time sweat”. Em: (2016).

- [23] Hyunjae Lee et al. “Wearable/disposable sweat-based glucose monitoring device with multistage transdermal drug delivery module”. Em: *Science Advances* 3.3 (2017), e1601314. ISSN: 23752548. DOI: [10.1126/sciadv.1601314](https://doi.org/10.1126/sciadv.1601314).
- [24] Adam Coates e Andrew Y. Ng. “Learning feature representations with K-means”. Em: *Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)* 7700 LECTU (2012), pp. 561–580. ISSN: 03029743. DOI: [10.1007/978-3-642-35289-8-30](https://doi.org/10.1007/978-3-642-35289-8-30).
- [25] Chire. *K-means convergence*. URL: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:K-means%7B%5C_%7Dconvergence.gif.
- [26] A. P. Dempster, N. M. Laird e D. B. Rubin. “Maximum Likelihood from Incomplete Data via the EM Algorithm”. Em: *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 39.1 (1977), pp. 1–38. ISSN: 00359246. URL: <http://www.jstor.org/stable/2984875>.
- [27] Chire. *EM-Gaussian-data*. URL: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:EM-Gaussian-data.svg>.
- [28] Sewaqu. *Linear Regression*. URL: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Linear%7B%5C_%7Dregression.svg.
- [29] Cyc. *Svm separating hyperplanes*. URL: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Svm%7B%5C_%7Dseparating%7B%5C_%7Dhyperplanes%7B%5C_%7D\(SVG\).svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Svm%7B%5C_%7Dseparating%7B%5C_%7Dhyperplanes%7B%5C_%7D(SVG).svg).
- [30] Christopher J. Harvey, Ryan F. LeBouf e Aleksandr B. Stefaniak. “Formulation and stability of a novel artificial human sweat under conditions of storage and use”. Em: *Toxicology in Vitro* 24.6 (2010), pp. 1790–1796. ISSN: 08872333. DOI: [10.1016/j.tiv.2010.06.016](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.06.016). URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2010.06.016>.
- [31] Sigma-Aldrich. *Water for ion chromatography, Specification sheet*. URL: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/DataSheetPage.do?brandKey=SIAL%7B%5C_%7DSymbol=00612.
- [32] Sigma-Aldrich. *D-(+)-Glucose solution Cell Culture Tested*. URL: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product%7B%5C_%7DInformation%7B%5C_%7DSheet/2/g8644pis.pdf.
- [33] Sigma Aldrich. *NaCl product specification*. URL: [https://www.sigmaaldrich.com/Graphics/COFAInfo/SigmaSAPQM/SPEC/S6/S6546/S6546-BULK%7B%5C_%7D%7B%5C_%7D%7B%5C_%7D%7B%5C_%7D%7B%5C_%7D%7B%5C_%7D%7B%5C_%7DSIAL%7B%5C_%7D%7B%5C_%7D%7B%5C_%7D%7B%5C_%7D%7B%5C_%7D%7B%5C_%7D.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/Graphics/COFAInfo/SigmaSAPQM/SPEC/S6/S6546/S6546-BULK%7B%5C_%7D%7B%5C_%7D%7B%5C_%7D%7B%5C_%7D%7B%5C_%7D%7B%5C_%7D%7B%5C_%7DSIAL%7B%5C_%7D%7B%5C_%7D%7B%5C_%7D%7B%5C_%7D%7B%5C_%7D.pdf).
- [34] Starna Scientific. *Starna Cells, catalog and price list*. 2018. URL: http://www.starnacells.com/d%7B%5C_%7Ddownload/Starna.pdf.

- [35] John E Bertie e Zhida Lan. “Infrared Intensities of Liquids XX: The Intensity of the OH Stretching Band of Liquid Water Revisited, and the Best Current Values of the Optical Constants of H₂O(l) at 25 °C between 15,000 and 1 cm⁻¹”. Em: 20.I (1996), pp. 1047–1057.
- [36] Analog Devices. *Integrated Optical Module for Smoke Detection*. 2018. URL: <https://www.analog.com/media/en/technical-documentation/data-sheets/adpd188bi.pdf>.
- [37] Teruaki Torii et al. “Measurements of glucose concentration in aqueous solutions using reflected THz radiation for applications to a novel sub-THz radiation non-invasive blood sugar measurement method”. Em: *Digital Health* 3 (2017), p. 205520761772953. ISSN: 2055-2076. DOI: [10.1177/2055207617729534](https://doi.org/10.1177/2055207617729534).
- [38] Diding Suhandy et al. “A quantitative study for determination of glucose concentration using attenuated total reflectance terahertz (ATR-THz) spectroscopy”. Em: *Engineering in Agriculture, Environment and Food* 5.3 (2012), pp. 90–95. ISSN: 18818366. DOI: [10.1016/S1881-8366\(12\)80020-6](https://doi.org/10.1016/S1881-8366(12)80020-6).
- [39] Zhong Hai He e Guang Shuai Zhu. “Variation of Absorption Coefficient of Glucose Water in Consideration of Water Displacement”. Em: *Advanced Materials Research* 159 (2010), pp. 358–362. DOI: [10.4028/www.scientific.net/amr.159.358](https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/amr.159.358).